

(21a)

O P I C  
OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ  
INTELLECTUELLE DU CANADA



C I P O  
CANADIAN INTELLECTUAL  
PROPERTY OFFICE

(12) (19) (CA) **Demande-Application**

(21) (A1) **2,223,877**  
(86) 1996/07/10  
(87) 1997/01/30

- (72) KÄSLER, Bruno, DE
- (72) SAHM, Hermann, DE
- (72) STAHMANN, Klaus-Peter, DE
- (72) SCHMIDT, Georg, DE
- (72) BÖDDECKER, Theo, DE
- (72) SEULBERGER, Harald, DE
- (71) BASF AKTIENGESSELLSCHAFT, DE
- (71) FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH, DE
- (51) Int.Cl.<sup>6</sup> C12N 15/60, C12P 25/00
- (30) 1995/07/13 (19525281.0) DE
- (30) 1995/12/06 (19545468.5) DE
- (54) **PROCEDE DE PRODUCTION DE RIBOFLAVINE AU MOYEN  
DE MICRO-ORGANISMES A ACTIVITE  
D'ISOCITRATLYASE MODIFIEE**
- (54) **PREPARATION OF RIBOFLAVIN USING MICROORGANISMS  
HAVING AN ALTERED ISOCITRATE LYASE ACTIVITY**

(57) Selon le procédé décrit, on utilise des microbes pour produire de la riboflavine. On cultive les micro-organismes producteurs de riboflavine dans un milieu de culture puis on isole la riboflavine ainsi produite. Le procédé se caractérise en ce que l'on utilise des micro-organismes dont l'activité endogène d'isocitratlyase (ICL) a été modifiée.

(57) A microbial riboflavin-production process is disclosed. Riboflavin-producing micro-organisms are cultivated in a culture medium and the thus produced riboflavin is then isolated. The process is characterised in that the endogenous isocitratlyase activity (ICL) of the micro-organisms used has been modified.



Industrie Canada Industry Canada

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro
**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b> <b>C12P 25/00, C12N 15/60, 15/31</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 97/03208</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. Januar 1997 (30.01.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP96/03009 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 10. Juli 1996 (10.07.96)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 195 25 281.0      13. Juli 1995 (13.07.95)      DE 195 45 468.5      6. December 1995 (06.12.95)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Lud- wigshafen (DE). FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; D-52428 Jülich (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KÄSLER, Bruno [DE/DE]; Magdeburger Strasse 72, D-67071 Ludwigshafen (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D- 52428 Jülich (DE). STAHMANN, Klaus-Peter [DE/DE]; Wilhelmstrasse 11, D-52428 Jülich (DE). SCHMIDT, Georg [DE/DE]; Heerstrasse 10, D-52457 Aldenhoven (DE). BÖDDECKER, Theo [DE/DE]; Robert-Koch-Strasse 7, D-52428 Jülich (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Adalbert-Stifter-Strasse 4, D-69221 Dossenheim (DE).  <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> RIBOFLAVIN-PRODUCTION PROCESS BY MEANS OF MICRO-ORGANISMS WITH MODIFIED ISOCITRATLYASE ACTIVITY		
<b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN MITTELS MIKROORGANISMEN MIT VERÄNDERTER ISOCITRATLYASE-AKTIVITÄT		
<b>(57) Abstract</b>		
A microbial riboflavin-production process is disclosed. Riboflavin-producing micro-organisms are cultivated in a culture medium and the thus produced riboflavin is then isolated. The process is characterised in that the endogenous isocitratlyase activity (ICL) of the micro-organisms used has been modified.		
<b>(57) Zusammenfassung</b>		
Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin durch Kultivierung von Riboflavin produzierenden Mikroorganismen in einem Nährmedium und anschließender Isolierung des hergestellten Riboflavins, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen verwendet werden, bei denen die endogene Isocitratlyase (ICL) Aktivität verändert wurde.		

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> :</b> <b>C12P 25/00, C12N 15/60, 15/31</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/03208</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 30. Januar 1997 (30.01.97)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP96/03009 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 10. Juli 1996 (10.07.96)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 195 25 281.0 13. Juli 1995 (13.07.95) DE 195 45 468.5 6. December 1995 (06.12.95) DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE). FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; D-52428 Jülich (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KÄSLER, Bruno [DE/DE]; Magdeburger Strasse 72, D-67071 Ludwigshafen (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE). STAHMANN, Klaus-Peter [DE/DE]; Wilhelmstrasse 11, D-52428 Jülich (DE). SCHMIDT, Georg [DE/DE]; Heerstrasse 10, D-52457 Aldenhoven (DE). BÖDDECKER, Theo [DE/DE]; Robert-Koch-Strasse 7, D-52428 Jülich (DE). SEULBERGER, Harald [DE/DE]; Adalbert-Stifter-Strasse 4, D-69221 Dossenheim (DE).  <b>(74) Gemeinsamer Vertreter:</b> BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> RIBOFLAVIN-PRODUCTION PROCESS BY MEANS OF MICRO-ORGANISMS WITH MODIFIED ISOCITRATLYASE ACTIVITY		
<b>(54) Bezeichnung:</b> VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON RIBOFLAVIN MITTELS MIKROORGANISMEN MIT VERÄNDERTER ISOCITRATLYASE-AKTIVITÄT		
<b>(57) Abstract</b> <p>A microbial riboflavin-production process is disclosed. Riboflavin-producing micro-organisms are cultivated in a culture medium and the thus produced riboflavin is then isolated. The process is characterised in that the endogenous isocitratlyase activity (ICL) of the micro-organisms used has been modified.</p>		
<b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin durch Kultivierung von Riboflavin produzierenden Mikroorganismen in einem Nährmedium und anschließender Isolierung des hergestellten Riboflavins, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen verwendet werden, bei denen die endogene Isocitratlyase (ICL) Aktivität verändert wurde.</p>		

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Herstellung von Riboflavin mittels Mikroorganismen mit veränderter Isocitratlyase-Aktivität

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Riboflavin mittels Mikroorganismen mit veränderter Isocitratlyase-Aktivität.

10

Das Vitamin B<sub>2</sub>, auch Riboflavin genannt, ist für Mensch und Tier essentiell. Bei Vitamin-B<sub>2</sub>-Mangel treten Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhäute, Risse in den Mundwinkeln, Juckreiz und Entzündungen in den Hautfalten u.ä. Hautschäden, Bindehautentzündungen, verminderte Sehschärfe und Trübung der Hornhaut auf. Bei Säuglingen und Kindern können Wachstumsstillstand und Gewichtsabnahme eintreten. Das Vitamin B<sub>2</sub> hat daher wirtschaftliche Bedeutung insbesondere als Vitaminpräparat bei Vitaminmangel sowie als Futtermittelzusatz. Daneben wird es auch als Lebensmittelfarbstoff, beispielsweise in Mayonnaise, Eiscreme, Pudding etc., eingesetzt.

Die Herstellung von Riboflavin erfolgt entweder chemisch oder mikrobiell. Bei den chemischen Herstellungsverfahren wird das Riboflavin in der Regel in mehrstufigen Prozessen als reines Endprodukt gewonnen, wobei relativ kostspielige Ausgangsprodukte - wie beispielsweise D-Ribose - eingesetzt werden müssen.

Eine Alternative zur chemischen Herstellung des Riboflavins bietet die Herstellung dieses Stoffes durch Mikroorganismen. Als Ausgangsprodukte für die mikrobielle Synthese können nachwachsende Rohstoffe, wie beispielsweise pflanzliche Öle, eingesetzt werden.

Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Ashbya gossypii* oder *Eremothecium ashbyii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983); aber auch Hefen, wie z.B. *Candida* oder *Saccharomyces*, und Bakterien, wie *Clostridium*, sind zur Riboflavinproduktion geeignet. Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme sind beispielsweise in der EP 405370 beschrieben, wobei die Stämme durch Transformation der Riboflavin-Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden. Diese Prokaryonten-Gene sind aber für ein rekombinantes Riboflavin-Herstellungsverfahren mit Eukaryonten wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ashbya gossypii* ungeeignet.

In WO 93/03183 ist die Klonierung der für die Riboflavin-Biosynthese spezifischen Gene aus dem eukaryontischen Organismus *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Mittels dieser Gene können rekombinante eukaryontische Mikroorganismen konstruiert werden, 5 die eine effiziente Riboflavinproduktion gestatten.

Häufig liegen jedoch die Ausgangsprodukte und Substrate der Riboflavinbiosynthese-Enzyme in dem Mikroorganismus in limitierter Menge vor, so daß trotz Erhöhung der Riboflavinbiosynthese - 10 Aktivität keine Steigerung in der Riboflavinproduktion erreicht wird.

Es bestand daher die Aufgabe ein verbessertes mikrobielles Verfahren zur Produktion von Riboflavin bereitzustellen, das Mikro- 15 organismen verwendet, die keine oder eine geringere Substratlimitierung besitzen und somit eine erhöhte Riboflavinproduktion erlauben.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß die verwendeten Mikroorganismen eine Veränderung in ihrer endogenen Isocitratlyaseaktivität besitzen. Die Veränderung ist gegenüber dem unveränderten Ausgangsstamm zu ermitteln. Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, solche Mikroorganismen mit veränderter ICL- 20 Aktivität zu erhalten.

25 Eine Möglichkeit besteht darin, das endogene ICL-Gen so zu verändern, daß es für ein Enzym mit gegenüber dem Ausgangsenzym erhöhter ICL-Aktivität codiert. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des 30 katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikation oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymbiosynthese reprimieren, hervorgerufen 35 werden. Die endogene ICL-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des endogenen ICL-Gens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch UV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien oder gezielt mittels gentechnischer Methoden wie 40 Deletionen, Insertionen oder Substitutionen.

Die ICL-Genexpression wird durch Erhöhen der ICL-Genkopienzahl und / oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die ICL-Genexpression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Ver- 45 stärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und Enhancer verwendet werden. Daneben ist aber auch

- eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird. Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das ICL-Gen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, der vorzugsweise das dem ICL-Gen zugeordnete
- 5 regulatorische Gensequenzen enthält, insbesondere solche, die die Genexpression verstärken. Anschließend wird ein Riboflavin-produzierenden Mikroorganismus mit dem das ICL-Gen enthaltende Genkonstrukt transformiert.
- 10 Das ICL-Gen wird vorzugsweise aus Mikroorganismen, insbesondere aus dem Pilz *Ashbya gossypii*, isoliert. Für die Isolierung des Gens kommen aber auch alle weiteren Organismen, deren Zellen die anaplerotische Sequenz des Glyoxylat-Cyclus und damit die Isocitratlyase enthalten, also auch Pflanzen, in Betracht. Die Isolierung des Gens kann durch homologe oder heterologe Komplementation
- 15 einer im ICL-Gen defekten Mutante oder auch durch heterologes Probing oder PCR mit heterologen Primern erfolgen. Zur Subklonierung kann das Insert des komplementierenden Plasmids anschließend durch geeignete Schnitte mit Restriktionsenzymen in
- 20 der Größe minimiert werden. Nach Sequenzierung und Identifizierung des putativen Gens erfolgt eine paßgenaue Subklonierung durch Fusions-PCR. Plasmide, die die so erhaltenen Fragmente als Insert tragen, werden in die ICL-Gen-defekte Mutante eingebracht, die auf Funktionalität des ICL-Gens getestet wird. Funktionelle
- 25 Konstrukte werden schließlich zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten eingesetzt.

Nach Isolierung und Sequenzierung sind Isocitratlyasegene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in SEQ ID NO:2 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren. Allelvariationen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die ICL-Aktivität aber erhalten bleibt.

- 35 Den Isocitratlyasegenen ist insbesondere ein Promotor der Nukleotidsequenz von Nukleotid 176 bis 550 gemäß SEQ ID NO:1 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz vorgeschaltet. So kann beispielsweise dem Gen ein Promotor vorgeschaltet sein, der
- 40 sich von dem Promotor mit der angegebenen Nukleotidsequenz durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) unterscheidet, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit des Promotors beeinträchtigt ist. Des weiteren kann der Promotor auch durch Veränderung seiner Sequenz in seiner
- 45 Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht werden.

Dem ICL-Gen können des weiteren regulatorische Gensequenzen bzw. Regulatorgene zugeordnet sein, die insbesondere die ICL-Gen-Aktivität erhöhen. So können dem ICL-Gen beispielsweise sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA eine erhöhte ICL-Genexpression bewirken.

Dem Isocitratlyasegen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Durch Klonierung des ICL-Gens sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das ICL-Gen enthalten und - wie bereits oben erwähnt - zur Transformation eines Riboflavin-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Ashbya gossypii* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d.h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Eine weitere Möglichkeit, Mikroorganismen mit veränderter ICL-Aktivität zu erzeugen, besteht darin, Mikroorganismen mit einer Resistenz gegenüber auf ICL hemmend wirkenden Substanzen zu erzeugen und diese zu selektionieren. Hemmstoffe der Isocitratlyase (ICL) sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Handbook of Enzyme Inhibitors, Herausgeber: Hellmut Zollner, Verlag Chemie, Weinheim, 1993, auf Seite 291 aufgeführt. Besonders geeignete Hemmstoffe sind Phosphoenolpyruvat (PEP), 6-P-Gluconat, Maleat, insbesondere aber Itaconat und Oxalat.

Werden nunmehr Riboflavin produzierende Mikroorganismen-Stämme in Gegenwart solcher Hemmstoffe kultiviert, zeigt sich überraschenderweise, daß die Riboflavinbildung gehemmt ist. Dies äußert sich auf Kulturplatten in der Ausbildung von Kolonien, die nicht gelb werden, sondern weiß bleiben. Mit diesem System sind daher Stämme leicht erkennbar, die gegen eine Isocitratlyase-Hemmung resistent sind, da solche Stämme auch in Gegenwart von Hemmstoff Riboflavin bilden und daher gelb gefärbte Kolonien ausbilden. Derartige Stämme können entweder durch Spontanmutation entstehen oder indem entsprechende Mutationen durch gängige Methoden, wie beispielsweise chemisch oder durch UV-Bestrahlung, induziert werden. Es können somit Mikroorganismen-Stämme gewonnen werden, die einen erhöhten Anteil an Riboflavin in das Kulturmedium ausscheiden. Als resistenter Stamm mit erhöhter Riboflavinbildung wurde ins-



besondere der bei der DSM unter der Nr. 10067 hinterlegte *Ashbya gossypii*-Stamm erhalten.

Als Mikroorganismus werden in dem erfindungsgemäßen Verfahren  
5 bevorzugt Pilze eingesetzt. Geeignete Pilze sind beispielsweise solche, die in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 aufgeführt sind.

Insbesondere sind solche der Gattungen *Pichia*, *Eremothetium* und  
10 *Ashbya*, besonders *Ashbya gossypii* geeignet.

Es können aber auch andere Mikroorganismen als Pilze, beispielsweise Bakterien, insbesondere die, die in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 16, Tabelle 6 aufgeführt sind, eingesetzt werden.  
15

#### Beispiel 1:

Erstellung einer genomischen Genbank aus *Ashbya gossypii*

20 Zur Erstellung einer genomischen DNA-Bank wurde chromosomale DNA nach der Methode von Wright und Philippsen (1991, Gene 109: 99-105) isoliert. Die DNA wurde partiell mit Sau 3A verdaut und mit einem Saccharose-Dichtegradienten fraktioniert. Die größten Fragmente (Figur 4) wurden mit dem Bam HI geschnittenen  
25 *E.coli*, *S.cerevisiae* Shuttlevektor YEp 352 (J.E. Hill et al., 1993, Yeast 2: 163-167) ligiert. Mit diesem Ligationsansatz wurde *E.coli* DH5  $\alpha$  transformiert. Von Platten mit Ampicillin und X-Gal wurden 3600 Kolonien isoliert, die durch ihre weiße Farbe als Klone mit Insert tragendem Plasmid erkennbar waren. Die Untersuchung von dreißig solcher zufällig ausgewählter Klone ergab, daß  
30 tatsächlich alle ein Plasmid trugen, diese Inserts im Größenbereich 7-18 kb hatten und alle Inserts verschieden waren, was anhand der Restriktionsmuster erkennbar war. Aufgrund einer Genomgröße von  $7 \times 10^3$  kb für *Ashbya gossypii* liegt die Wahrscheinlichkeit, das jedes Gen in dieser Genbank enthalten ist, bei 97 % -  
35 99,99 %. Je 100 Klone wurden auf einer Agarplatte in großen Ausstrichen kultiviert und danach die Plasmide als Pool präpariert. Die Genbank bestand dementsprechend aus 36 Plasmidpools.

#### 40 Beispiel 2:

Selektion des *icl1*-tragenden Genbankfragments

Mit den Plasmidpräparationen der Genbank wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ICL1d *ura3(fs)* (E. Fernández et al., 1992, Eur.  
45 J. Biochem. 204: 983-990) transformiert. Diese Mutante ist im *ICL1*-Gen disruptiert und besitzt im *ura3*-Gen eine Mutation im Leserahmen. Dieser Genotyp führt dazu, daß der Stamm nicht auf

Ethanol als Kohlenstoffquelle wachsen kann und eine Uracil-Auxotrophie zeigt. Im ersten Schritt wurden die mit der Genbank transformierten Hefezellen auf Minimalmedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle selektioniert. Aufgrund des auf dem

5 Plasmid vorhandenen *ura3*-Gens konnten nur die Zellen wachsen, die ein Plasmid aufgenommen hatten, denn das Minimalmedium enthielt kein Uracil. In diesem Schritt wurden 1900 Klone erhalten. Diese wurden durch Replikaplattierung auf ein Minimalmedium mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle übertragen. Da zum Wachstum auf

10 Ethanol unbedingt die Isocitratlyase als anaplerotisches Enzym nötig ist, konnten nur die Klone wachsen, die auf dem Plasmid das ICL-Gen trugen. Es konnten zwei Klone isoliert werden, die auf Ethanol wuchsen.

### 15 Beispiel 3:

#### Überprüfung der Funktionalität des isolierten Genbankfragments

Zur Überprüfung, ob die Komplementation des chromosomalen ICL-Defekts plasmid-kodiert war, wurden die selektionierten Saccharo-

20 myces-Klone zweimal auf Vollmedium mit Uracil kultiviert und die erhaltenen Zellen auf Platten vereinzelt. Von 16 bzw. 13 zufällig ausgewählten Klonen wuchsen 7 bzw. 5 nicht mehr auf Minimalmedium mit Glucose. Genau diese Klone wuchsen auch nicht mehr auf Minimalmedium mit Ethanol. Die Kurierung vom Plasmid war also mit dem

25 Verlust der ICL1d-Komplementation korreliert.

Aus einem der beiden Klone wurde das Plasmid wieder isoliert. Es enthielt ein Insert von etwa 8 kb. Erneute Transformation der Saccharomyces. Mutante führte zur Komplementation aller gefunde-

30 nen Klone. Das 8 kb - Fragment ließ sich durch Sph I auf 2,9 kb, die voll funktionell waren, verkürzen.

Im Rohextrakt der auf Ethanol gewachsenen Transformante war die Isocitratlyase mit einer spezifischen Aktivität von 0,3 U/mg Protein meßbar. Zudem zeigte der Westernblott mit polyklonalen Antikörpern gegen die Ashbya-ICL ein deutliches Signal.

35

PCR mit von tryptischen Peptiden der ICL abgeleiteten Primern ergab starke Signale der erwarteten Größe. Aus einem zweidimensionalen Elektrophoresegel wurde ein Protein isoliert, mit Trypsin in Peptide zerlegt und durch Edmannabbau ansequenziert. Der Vergleich der Peptidsequenzen mit Datenbanken ergab eine Identität von über 70 % mit der Isocitratlyase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Davon abgeleitete Primer wurden zur PCR eingesetzt.

40

45 Von dem ca. 8 kb großen komplementierenden Genbankfragment wurden 3,3 kb sequenziert (Sanger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467). Auf der ermittelten Sequenz konnten durch

Datenbankvergleich zwei kodierende Bereiche gefunden werden. Ein Leserahmen von 1680 Basen (SEQ ID NO:1) zeigt eine 65 %ige Identität zum ICL1-Gen von *Saccharomyces cerevisiae*. Das ICL-Gen liegt 375 Basen upstream von einer Sequenz die 84 % Identität zu einer Ser-tRNA von *Saccharomyces cerevisiae* zeigt (SEQ ID NO:1).

Beispiel 4:

Funktionalität subklonierter ICL in einem *E.coli*/Hefe/*Ashbya* - Shuttlevektor

10

Zwei durch Restriktionsverdau erhaltene Fragmente und ein PCR-Produkt des isolierten Genbankfragments (Figur 5) wurden in das von Steiner und Philippsen (1994, Mol. Gen. Genet 242: 263-271) konstruierte Plasmid pAG 100 (Figur 6) kloniert. Bei den Fragmenten handelte es sich um ein 2.9 kb Sph I- Fragment (pAG 100 icl.4) und um ein 2.2 kb Bgl 1 / Eco RV - Fragment (pAG 100 icl.6). Beide Fragmente enthielten die Ser-tRNA. Deshalb wurde zusätzlich eine PCR-Amplifikation des putativen Gens mit daran fusionierten Bam HI - Schnittstellen (pAG 100 icl.8) durchgeführt.

20 Alle drei DNAs wurden in die Bam HI site des Plasmids pAG 100 kloniert. Mit den erhaltenen Plasmiden wurde die Hefemutante *Saccharomyces cerevisiae* ICL1d ura3 (fs) transformiert. Alle drei Konstrukte führten zur vollständigen Komplementation der ICL1d-Disruption d.h. trugen funktionelle Gene.

25

Beispiel 5:

Wirkung der ICL tragenden Plasmide auf die Riboflavinbildung von *Ashbya gossypii*

30 Die Transformation von *Ashbya gossypii* (Methode: Wright und Philippsen, 1991, Gene 109: 99-105) mit den oben erklärten Plasmiden führte zu signifikanten Erhöhungen der Riboflavinbildung. Kultiviert wurde in 500 ml Schüttelkolben mit zwei Schikanen, das 50 ml Medium aus 10 g/l Sojaöl, 10 g/l Hefeextrakt und 200 µg/ml Geneticin enthielt. Der Kontrollstamm *A.gossypii* pAG 100, der ein Plasmid ohne Insert enthielt, produzierte in zwei Tagen  $18,7 \pm 0,1$  mg/l Riboflavin. Die Stämme *A. gossypii* pAG 100.4 und *A.gossypii* pAG 100.6 produzierten  $31,2 \pm 6,1$  mg/l bzw.  $31,0 \pm 2,0$  mg/l Riboflavin (Figur 7). Eine signifikante Änderung der spezifischen Aktivität der Isocitratlyase war aufgrund der starken Streuung nicht messbar. Der Stamm *A. gossypii* pAG 100.8 produzierte in einem Medium, das noch durch 3 g/l Glycin supplementiert wurde, innerhalb von drei Tagen  $65 \pm 5,6$  mg/l Riboflavin. Der Kontrollstamm *A.gossypii* pAG 100 bildete dagegen im direkten Vergleich nur  $29,9 \pm 1,8$  mg/l Riboflavin (Figur 8). Weder in der spezifi-

schen Aktivität der Isocitratlyase noch im Myzeltrockengewicht waren signifikante Unterschiede meßbar.

Beispiel 6:

5 Reinigung einer Isocitratlyase (ICL)

Zur Identifizierung von auf ICL hemmend wirkenden Substanzen wurde zunächst die ICL aus *Ashbya gossypii* gereinigt. Die Isolierung und Reinigung des Enzyms erfolgte 10 nach Wachstum des Pilz-  
mycels auf Pflanzenöl. Die einzelnen Reinigungsschritte sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt: Demgemäß enthält ein typischer, aus ca. 25 g Mycel hergestellter Rohextrakt, der durch Zellaufschluß mit einer French-Press gewonnen wurde, 220 Einheiten ICL-Aktivität. Etwa 78% davon sind nach Zentrifugation bei 40.000 g  
15 gelöst im Überstand wiederzufinden. Eine anschließende fraktionierte Ammoniumsulfatfällung führt zu einer dreifachen Anreicherung des Enzyms. Nach einer Gelfiltration mit einer Sephacryl S-300 Säule wird die TCL an den Kationenaustauscher Mono S-Sepharose gebunden und mit NaCl eluiert. Das so erhaltene Präparat ist  
20 homogen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und hat eine spezifische Aktivität von 18,4 U/mg.

Beispiel 7:

Identifizierung von ICL-Hemmstoffen

25

Mit dem gereinigten Enzym lassen sich in einem colorimetrischen Test (Dixon, H. und Kornberg, H.L. (1959), Biochem. J. 72, 3: Assay methods for key enzymes of the glyoxylate cycle) Einflüsse von Substanzen auf die Aktivität messen. In Tabelle 2 und Figur 1  
30 sind die Effekte der getesteten Substanzen auf das Enzym zusammengefaßt bzw. dargestellt. Untersucht wurden zum einen Substanzen, die als Metaboliten in der Pilzzelle einen hemmenden Effekt auf das Enzym haben könnten. Darunter zeigten 6-P-Gluconat und Phosphoenolpyruvat die deutlichsten Hemmwirkungen mit über  
35 50% bei einer Konzentration von 10 mM. Erheblich besser wirkten jedoch Itakonat und Oxalat, die vermutlich nicht im Stoffwechsel des Pilzes vorkommen. Bereits eine Konzentration von 1 mmol führte zu 78% bzw. 95% Hemmung.

40 Beispiel 8:

Charakterisierung einer mit Itakonat selektierten Mutante

Durch UV-Bestrahlung von isolierten Sporen des Pilzes lassen sich Mutationen im Erbmaterial erzeugen. Mit einer Strahlendosis, bei  
45 der 10-20% der eingesetzten Sporen überleben, erhält man Mutanten, die gegen eine Hemmung der Riboflavinbildung durch Itakonat resistent sind. Eine so isolierte Mutante zeigt bei Wachstum auf

Sojaöl eine 25-fache Riboflavinbildung im Vergleich zum Ausgangsstamm (Figur 2). Die spezifische ICL-Aktivität ist während der Riboflavinbildungsphase um bis zu 15% erhöht (Figur 2). Mit Antikörpern läßt sich zeigen, daß die Proteinmenge erhöht ist. Die ICL aus der Mutante zeigt das gleiche Hemmverhalten durch Itakonat wie der Ausgangsstamm.

#### Beispiel 9:

Korrelation von Riboflavinbildung und spezifischer ICL-Aktivität

10

Einen überraschenden Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen ICL und Riboflavinbildung liefert die Beobachtung, daß der Pilz, wenn Glucose als Substrat angeboten wird, erst nach Verbrauch der Glucose mit der Produktion beginnt. Genau dann wird auch die ICL, die zuvor durch Glucose reprimiert ist, im Rohextrakt meßbar und steigt bis zu Aktivitäten, wie sie bei Wachstum auf Öl gefunden werden, an (Figur 3).

20

25

30

35

40

45

10  
SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
  - (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
  - (C) ORT: Ludwigshafen
  - (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
  - (F) POSTLEITZAHL: D-67056
  - (G) TELEPHON: 0621/6048526
  - (H) TELEFAX: 0621/6043123
  - (I) TELEX: 1762175170
- 
- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
  - (B) STRASSE: Leo-Brandt-Strasse
  - (C) ORT: Juelich
  - (E) LAND: Germany
  - (F) POSTLEITZAHL: D-52425
  - (G) TELEPHON: 02461-61 3004

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Herstellung von Riboflavin  
mittels Mikroorganismen mit veraenderter Isocitratlyase  
Aktivitaet

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 2364 Basenpaare
- (B) ART: Nukleins"ure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÄLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..550

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 551..2233

## (ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 2234..2364

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGAAAGCGCC AAATACCGGA AACGGCACAG GCGCAGCTCT AATAGCCGTT CCACGATAAC	60
TTTGGAAGTT ATGGCACTAT GGCCGAGTGG TTAAGGCGAC AGACTTGAAA TCTGTTGGGC	120
TCTGCCCCGCG CTGGTTCAAA TCCTGCTGGT GTCGTTATTT TTGCCGTTTC TTTT TAGATG	180
AAACTCAGGG GCCTTTAGTC CGCCCTTTTG CCCGCTGATT CATCGCCCCG CAGCAACACC	240
GGTTGAGCCG ATCAGCGCAA GAACGCGCAA AGTCACGTAT GGCCCTAAG AGTTGAGCTC	300
TCCCCCTCGG CTCCTTCCGG GCGCGGAAAA GCCTGCGTCA CCCCATTAAG TCCGAAACCG	360
CGTTCAAGTG TACTTGGTCC GGGCCAATGT GGTTGCCTCA TCCGAGTCAC CGATACGCAG	420
GTGCGCCCGT CGAGTCACCA TTAGGAGTAG AGCATCTGAT TATATATAGG CCTAGTTACA	480
GCGGTAACAT AGACTGATAG CTCCAGCTCC AGCACTAGCT TG TAGGACAT CTGCGCGACA	540
CCCAGTGAAC ATG TCC CCT TCC GTC AGA GAC GCC CGC AAC GAC CTT GCC	589
Met Ser Pro Ser Val Arg Asp Ala Arg Asn Asp Leu Ala	
1 5 10	
AGC CTG CAA CAG CAG GCA GCC GCC GAA GCC GAG GAT ATT AGG AGA TGG	637
Ser Leu Gln Gln Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Asp Ile Arg Arg Trp	
15 20 25	
TGG AGC CAG CCA CGG TGG GCG GGC ACC AAG CGC GTG TAC ACG GCC GAG	685
Trp Ser Gln Pro Arg Trp Ala Gly Thr Lys Arg Val Tyr Thr Ala Glu	
30 35 40 45	
GAC ATC GTC AAG CGC CGC GGC ACG TTC CCT GTC GTC GAA TAC CCA TCT	733
Asp Ile Val Lys Arg Arg Gly Thr Phe Pro Val Val Glu Tyr Pro Ser	
50 55 60	
TCC GTA ATG GCG GAC AAG CTC GTG GAG ACA TTG GCG CGG CAC TCG CGC	781
Ser Val Met Ala Asp Lys Leu Val Glu Thr Leu Ala Arg His Ser Arg	
65 70 75	
AAC GGC ACG GTT TCA CAG ACG TTC GGA GTG CTC GAC CCA GTG CAA ATG	829
Asn Gly Thr Val Ser Gln Thr Phe Gly Val Leu Asp Pro Val Gln Met	
80 85 90	
ACG CAA ATG GTG AAG TAT CTG GAC ACG ATT TAC GTG TCT GGC TGG CAA	877
Thr Gln Met Val Lys Tyr Leu Asp Thr Ile Tyr Val Ser Gly Trp Gln	
95 100 105	
TGC AGC GCC ACG GCT TCG ACC TCG AAC GAG CCT GGG CCC GAT CTC GCG	925
Cys Ser Ala Thr Ala Ser Thr Ser Asn Glu Pro Gly Pro Asp Leu Ala	
110 115 120 125	
GAC TAT CCG ATG GAC ACC GTG CCA AAC AAG GTC GAG CAC CTG TTC ATG	973
Asp Tyr Pro Met Asp Thr Val Pro Asn Lys Val Glu His Leu Phe Met	

130					135					140						
GCG	CAG	CTG	TTC	CAC	GAC	CGG	AAA	CAG	CGC	GAG	GCC	CGC	CTG	TCG	TGC	1021
Ala	Gln	Leu	Phe	His	Asp	Arg	Lys	Gln	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Cys	
145					150					155						
ACT	ACC	CAG	CGC	GAG	CTC	GAC	CAA	TTG	GGG	CCT	GAG	ATT	GAC	TAC	TTG	1069
Thr	Thr	Gln	Arg	Glu	Leu	Asp	Gln	Leu	Gly	Pro	Glu	Ile	Asp	Tyr	Leu	
160					165					170						
AGG	CCG	ATT	GTC	GCT	GAC	GCA	GAC	ACC	GGC	CAC	GGC	GGG	CTA	ACA	GCC	1117
Arg	Pro	Ile	Val	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala	
175					180					185						
GTC	TTT	AAA	CTC	ACG	AAG	ATG	TTC	ATC	GAG	CGC	GGT	GCA	GCC	GGT	ATC	1165
Val	Phe	Lys	Leu	Thr	Lys	Met	Phe	Ile	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile	
190					195					200					205	
CAC	ATG	GAG	GAC	CAG	TCC	TCC	AGC	AAC	AAA	AAG	TGC	GGG	CAC	ATG	GCG	1213
His	Met	Glu	Asp	Gln	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Lys	Cys	Gly	His	Met	Ala	
210					215					220						
GGC	CGC	TGC	GTG	ATC	CCT	GTT	CAG	GAG	CAC	ATT	AGT	CGT	TTA	GTG	ACT	1261
Gly	Arg	Cys	Val	Ile	Pro	Val	Gln	Glu	His	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	
225					230					235						
GTG	CGC	ATG	TGT	GCG	GAC	GTG	ATG	CAC	TCG	AAC	CTG	GTG	CTT	GTC	GCG	1309
Val	Arg	Met	Cys	Ala	Asp	Val	Met	His	Ser	Asn	Leu	Val	Leu	Val	Ala	
240					245					250						
AGA	ACA	GAC	TCG	GAG	GCC	GCC	ACC	TTA	CTT	AGC	TCG	AAC	ATT	GAC	GCG	1357
Arg	Thr	Asp	Ser	Glu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala	
255					260					265						
CGC	GAT	CAT	TAC	TAC	ATT	GTC	GGG	GCC	TCG	AAC	CCT	GAG	GTA	ACT	GTA	1405
Arg	Asp	His	Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Thr	Val	
270					275					280					285	
CCG	CTG	ATC	GAA	GTT	TTG	GAC	GCC	GCG	CAG	CAG	GCC	GGC	GCC	TCA	GGT	1453
Pro	Leu	Ile	Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Gly	
290					295					300						
GAC	AGA	TTG	GCT	CAG	CTA	GAG	GAG	GAC	TGG	TGC	AAG	AAG	GCC	AAG	TTG	1501
Asp	Arg	Leu	Ala	Gln	Leu	Glu	Glu	Asp	Trp	Cys	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	
305					310					315						
AGG	CTC	TTC	CAC	GAG	GCA	TTT	GCC	GAC	CAG	GTG	AAT	GCC	AGC	CCT	TCG	1549
Arg	Leu	Phe	His	Glu	Ala	Phe	Ala	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	
320					325					330						
ATC	AAA	GAC	AAG	GCG	GGC	GTT	ATT	GCC	AAA	TTT	AAC	TCA	CAG	ATC	GGG	1597
Ile	Lys	Asp	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Lys	Phe	Asn	Ser	Gln	Ile	Gly	
335					340					345						
CCA	CAG	ACA	GGC	GCG	TCG	ATC	AGA	GAG	ATG	CGC	AAA	CTG	GGC	CGC	GAG	1645
Pro	Gln	Thr	Gly	Ala	Ser	Ile	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	Leu	Gly	Arg	Glu	
350					355					360					365	



## 13

CTG	CTC	GGG	CAG	GAC	GTC	TAC	TTC	GAC	TGG	GAC	CTG	CCT	CGC	GCT	AGA	1693
Leu	Leu	Gly	Gln	Asp	Val	Tyr	Phe	Asp	Trp	Asp	Leu	Pro	Arg	Ala	Arg	
				370					375					380		
GAG	GGC	TTG	TAC	CGC	TAC	AAG	GGC	GGC	ACC	CAG	TGC	GCG	ATC	ATG	CGC	1741
Glu	Gly	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Lys	Gly	Gly	Thr	Gln	Cys	Ala	Ile	Met	Arg	
			385					390					395			
GCA	CGC	GCG	TTC	GCG	CCG	TAC	GCC	GAC	CTG	GTC	TGG	TTC	GAA	TCC	AAC	1789
Ala	Arg	Ala	Phe	Ala	Pro	Tyr	Ala	Asp	Leu	Val	Trp	Phe	Glu	Ser	Asn	
		400					405					410				
TTC	CCT	GAC	TTC	CAG	CAG	GCT	AAG	GAG	TTT	GCG	CAG	GGC	GTG	CGC	GAG	1837
Phe	Pro	Asp	Phe	Gln	Gln	Ala	Lys	Glu	Phe	Ala	Gln	Gly	Val	Arg	Glu	
	415					420					425					
AAG	TTC	CCC	AAC	AAG	TGG	ATG	GCC	TAC	AAC	TTG	TCG	CCC	AGC	TTC	AAC	1885
Lys	Phe	Pro	Asn	Lys	Trp	Met	Ala	Tyr	Asn	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Asn	
430					435					440					445	
TGG	CCG	AAG	GCC	ATG	CCT	CCC	AAG	GAG	CAG	GAG	AAC	TAC	ATC	CAA	CGG	1933
Trp	Pro	Lys	Ala	Met	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Glu	Asn	Tyr	Ile	Gln	Arg	
				450					455					460		
CTG	GGC	GAG	ATC	GGA	TAT	GTG	TGG	CAG	TTC	ATC	ACG	CTA	GCC	GGC	CTG	1981
Leu	Gly	Glu	Ile	Gly	Tyr	Val	Trp	Gln	Phe	Ile	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	
			465					470					475			
CAT	ACC	AAT	GCC	TTG	GCC	ATC	GAC	AAC	TTC	TCG	CGC	GAA	TTC	AGC	AGG	2029
His	Thr	Asn	Ala	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Phe	Ser	Arg	Glu	Phe	Ser	Arg	
		480					485					490				
TTC	GGA	ATG	CGT	GCG	TAT	GCA	CAA	GGC	ATC	CAG	CAG	AGG	GAG	ATG	GAC	2077
Phe	Gly	Met	Arg	Ala	Tyr	Ala	Gln	Gly	Ile	Gln	Gln	Arg	Glu	Met	Asp	
	495					500					505					
GAG	GGC	GTC	GAT	GTC	CTA	AAA	CAC	CAG	AAG	TGG	GCC	GGC	GCA	GAG	TAT	2125
Glu	Gly	Val	Asp	Val	Leu	Lys	His	Gln	Lys	Trp	Ala	Gly	Ala	Glu	Tyr	
510					515					520				525		
GTT	GAC	AGC	ATT	CTC	AAG	CTT	GCC	CAG	GGC	GGT	GTG	TCT	TCG	ACA	GCC	2173
Val	Asp	Ser	Ile	Leu	Lys	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Thr	Ala	
				530					535					540		
TCG	ATG	GGT	AAG	GGT	GTA	ACC	GAA	GAG	CAG	TTC	GGC	TCC	TCA	AAC	GGT	2221
Ser	Met	Gly	Lys	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe	Gly	Ser	Ser	Asn	Gly	
			545					550					555			
GCC	AAA	CTA	TGATATCATC	TCTGAGTCAT	TTCTCTCGAC	AAGATCCTCG										2270
Ala	Lys	Leu														
		560														
GCCAGACTTC	TGGAATATAT	ATAACATCGG	GTACCCCGAC	ATCCCTGCCT	TCCGCAACGT											2330
GCGAAGCAGC	TGATACGTAT	ACTTTAAACG	CACA													2364

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 560 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ser	Pro	Ser	Val	Arg	Asp	Ala	Arg	Asn	Asp	Leu	Ala	Ser	Leu	Gln	1		5		10		15
Gln	Gln	Ala	Ala	Ala	Glu	Ala	Glu	Asp	Ile	Arg	Arg	Trp	Trp	Ser	Gln		20		25		30	
Pro	Arg	Trp	Ala	Gly	Thr	Lys	Arg	Val	Tyr	Thr	Ala	Glu	Asp	Ile	Val		35		40		45	
Lys	Arg	Arg	Gly	Thr	Phe	Pro	Val	Val	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Val	Met		50		55		60	
Ala	Asp	Lys	Leu	Val	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	His	Ser	Arg	Asn	Gly	Thr		65		70		75	
Val	Ser	Gln	Thr	Phe	Gly	Val	Leu	Asp	Pro	Val	Gln	Met	Thr	Gln	Met			85		90		95
Val	Lys	Tyr	Leu	Asp	Thr	Ile	Tyr	Val	Ser	Gly	Trp	Gln	Cys	Ser	Ala		100		105		110	
Thr	Ala	Ser	Thr	Ser	Asn	Glu	Pro	Gly	Pro	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	Pro		115		120		125	
Met	Asp	Thr	Val	Pro	Asn	Lys	Val	Glu	His	Leu	Phe	Met	Ala	Gln	Leu		130		135		140	
Phe	His	Asp	Arg	Lys	Gln	Arg	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser	Cys	Thr	Thr	Gln		145		150		155	
Arg	Glu	Leu	Asp	Gln	Leu	Gly	Pro	Glu	Ile	Asp	Tyr	Leu	Arg	Pro	Ile			165		170		175
Val	Ala	Asp	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala	Val	Phe	Lys		180		185		190	
Leu	Thr	Lys	Met	Phe	Ile	Glu	Arg	Gly	Ala	Ala	Gly	Ile	His	Met	Glu		195		200		205	
Asp	Gln	Ser	Ser	Ser	Asn	Lys	Lys	Cys	Gly	His	Met	Ala	Gly	Arg	Cys		210		215		220	
Val	Ile	Pro	Val	Gln	Glu	His	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Thr	Val	Arg	Met		225		230		235	
Cys	Ala	Asp	Val	Met	His	Ser	Asn	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Arg	Thr	Asp			245		250		255
Ser	Glu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Ala	Arg	Asp	His		260		265		270	

15

Tyr	Tyr	Ile	Val	Gly	Ala	Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Thr	Val	Pro	Leu	Ile	275	280	285
Glu	Val	Leu	Asp	Ala	Ala	Gln	Gln	Ala	Gly	Ala	Ser	Gly	Asp	Arg	Leu	290	295	300
Ala	Gln	Leu	Glu	Glu	Asp	Trp	Cys	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	Arg	Leu	Phe	305	310	315
His	Glu	Ala	Phe	Ala	Asp	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Pro	Ser	Ile	Lys	Asp	325	330	335
Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Lys	Phe	Asn	Ser	Gln	Ile	Gly	Pro	Gln	Thr	340	345	350
Gly	Ala	Ser	Ile	Arg	Glu	Met	Arg	Lys	Leu	Gly	Arg	Glu	Leu	Leu	Gly	355	360	365
Gln	Asp	Val	Tyr	Phe	Asp	Trp	Asp	Leu	Pro	Arg	Ala	Arg	Glu	Gly	Leu	370	375	380
Tyr	Arg	Tyr	Lys	Gly	Gly	Thr	Gln	Cys	Ala	Ile	Met	Arg	Ala	Arg	Ala	385	390	395
Phe	Ala	Pro	Tyr	Ala	Asp	Leu	Val	Trp	Phe	Glu	Ser	Asn	Phe	Pro	Asp	405	410	415
Phe	Gln	Gln	Ala	Lys	Glu	Phe	Ala	Gln	Gly	Val	Arg	Glu	Lys	Phe	Pro	420	425	430
Asn	Lys	Trp	Met	Ala	Tyr	Asn	Leu	Ser	Pro	Ser	Phe	Asn	Trp	Pro	Lys	435	440	445
Ala	Met	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Glu	Asn	Tyr	Ile	Gln	Arg	Leu	Gly	Glu	450	455	460
Ile	Gly	Tyr	Val	Trp	Gln	Phe	Ile	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	His	Thr	Asn	465	470	475
Ala	Leu	Ala	Ile	Asp	Asn	Phe	Ser	Arg	Glu	Phe	Ser	Arg	Phe	Gly	Met	485	490	495
Arg	Ala	Tyr	Ala	Gln	Gly	Ile	Gln	Gln	Arg	Glu	Met	Asp	Glu	Gly	Val	500	505	510
Asp	Val	Leu	Lys	His	Gln	Lys	Trp	Ala	Gly	Ala	Glu	Tyr	Val	Asp	Ser	515	520	525
Ile	Leu	Lys	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Val	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Met	Gly	530	535	540
Lys	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Gln	Phe	Gly	Ser	Ser	Asn	Gly	Ala	Lys	Leu	545	550	555

## Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Riboflavin durch  
5 Kultivierung von Riboflavin produzierenden Mikroorganismen in einem Nährmedium und anschließender Isolierung des hergestellten Riboflavins, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen verwendet werden, bei denen die endogene Isocitrat-lyase (ICL) Aktivität verändert wurde.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen durch Mutation des endogenen ICL-Gens ein Enzym mit höherer ICL-Aktivität aufweisen.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen durch eine Erhöhung der ICL-Genkopienzahl eine höhere ICL-Genexpression besitzen.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das ICL-Gen mit regulatorischen DNA-Sequenzen funktionell verknüpft wurde, die eine verstärkte Genexpression des ICL-Gens erlauben.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Mikroorganismen mit Resistenz gegenüber auf ICL hemmend wirkenden Substanzen verwendet werden.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen resistent gegenüber den Stoffen Itakonat oder Oxalat sind.
- 35 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismus ein Pilz verwendet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Pilz aus der Gattung Ashbya verwendet wird.
9. ICL-Gen codierend für die in SEQ ID NO: 2 dargestellte Aminosäuresequenz.
- 40 10. Genkonstrukt enthaltend ein ICL-Gen gemäß Anspruch 9.
11. Genkonstrukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß das ICL-Gen funktionell mit einem oder mehreren Regulations-  
45 signalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft wurde.

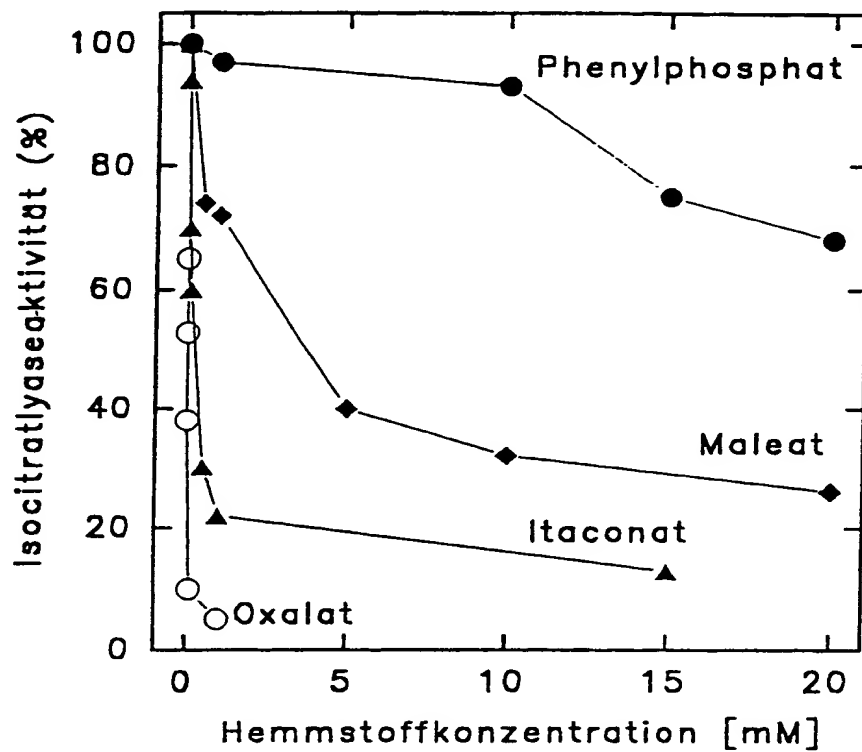
Fraktion	Gesamtaktivität (Units)	Gesamtprotein (mg)	spez. Aktivität (U/mg protein)	Reinigungsfaktor (-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	220	1310	0.17	1.0	100
40,000 g Überstand	170	730	0.23	1.3	78
35% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Überstand	160	630	0.25	1.5	72
60% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Pellet	160	300	0.53	3.1	72
Sephacryl S-300 Eluat	52	5	10.8	63	23
Mono S Eluat	35	0.5	18.4	108	16

Tabelle 1.

Hemmstoff	Konzentration (mM)	Hemmung (%)	Hemmtyp
Glucose-6-P	10	<5	
Citrat	10	22	
Fumarat	10	25	
Succinat	10	34	noncompetitive; $K_i$ : 15.8 mM
Malat	10	36	
PEP	10	55	hyperbolic mixed-type
6-P-Gluconat	10	60	
Glycin	10	<5	
Aspartat	10	13	
Glutamat	10	15	
Phenylphosphat	10	7	
Maleat	10	68	
Itaconat	1	78	linear mixed-type; $K_i$ : 0.17 mM
Oxalat	1	95	noncompetitive; $K_i$ : 0.004 mM

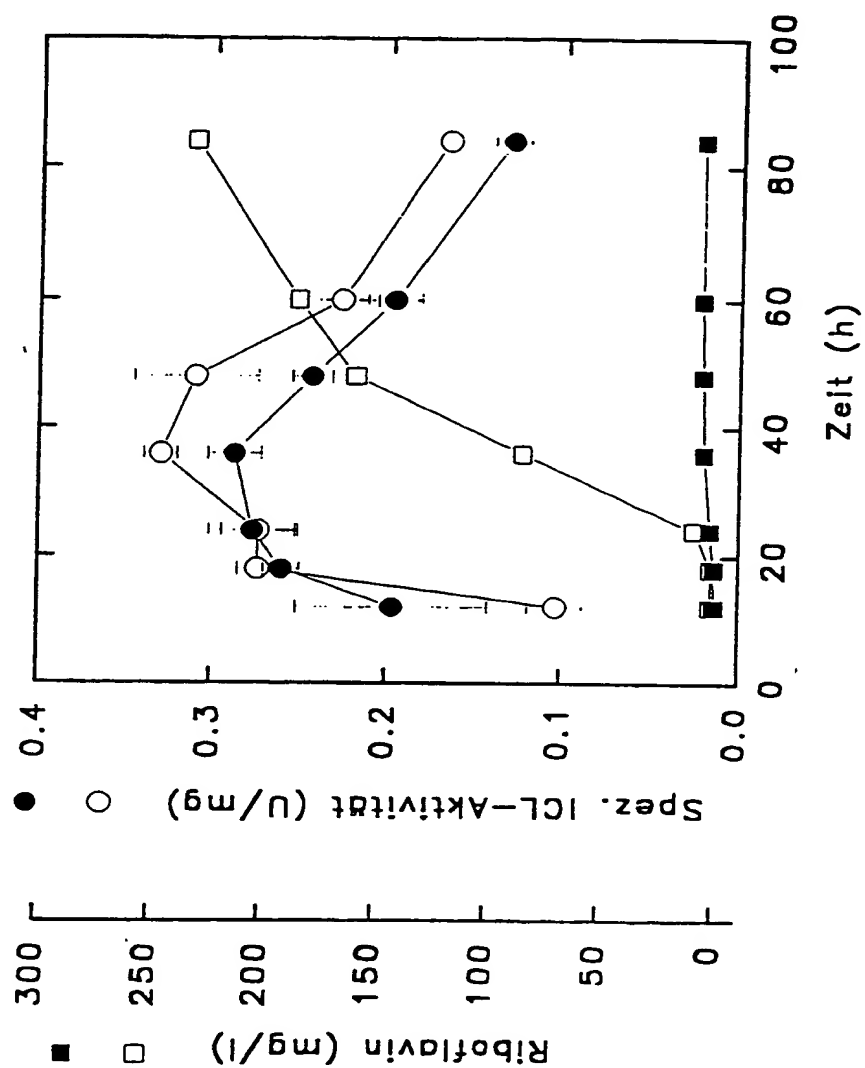
Tabelle 2.

3/10



Figur 1

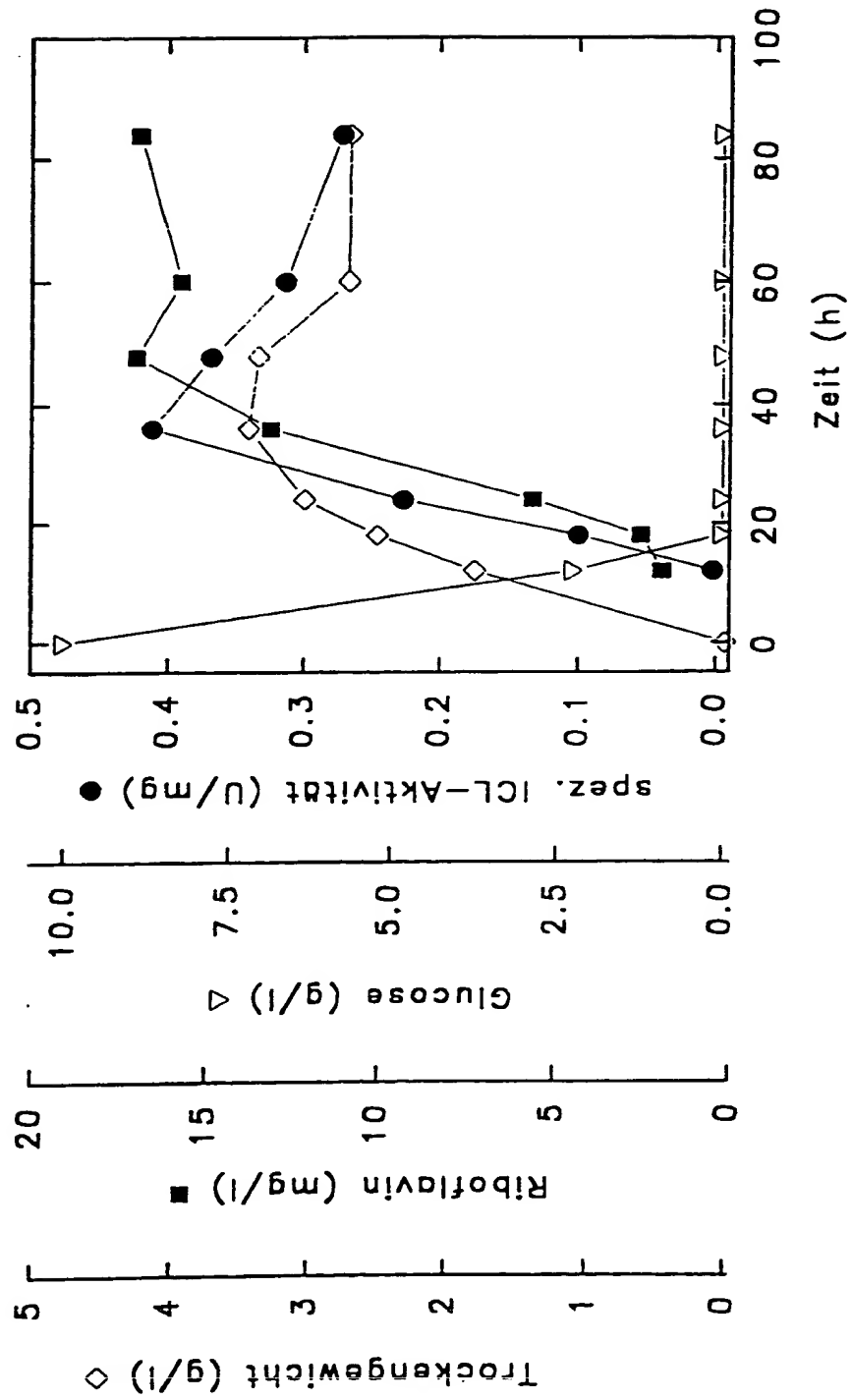
4/10



Figur 2



5/10



Figur 3

6/10

Standards



23,1 kb

9,4 kb

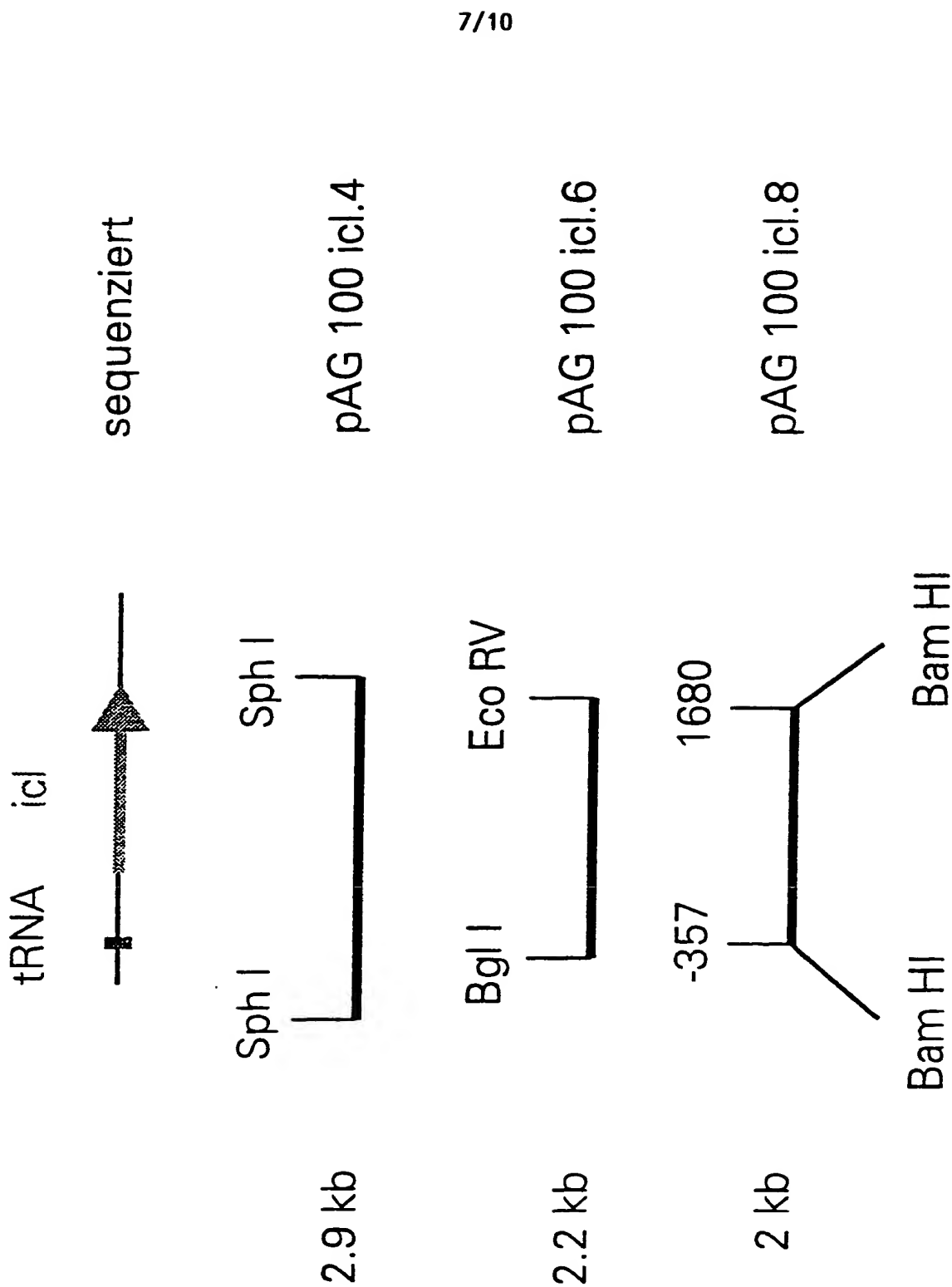
6,5 kb

2,3 kb



Fraktionen des Sau 3A - Verdaus  
nach Ultrazentrifugation

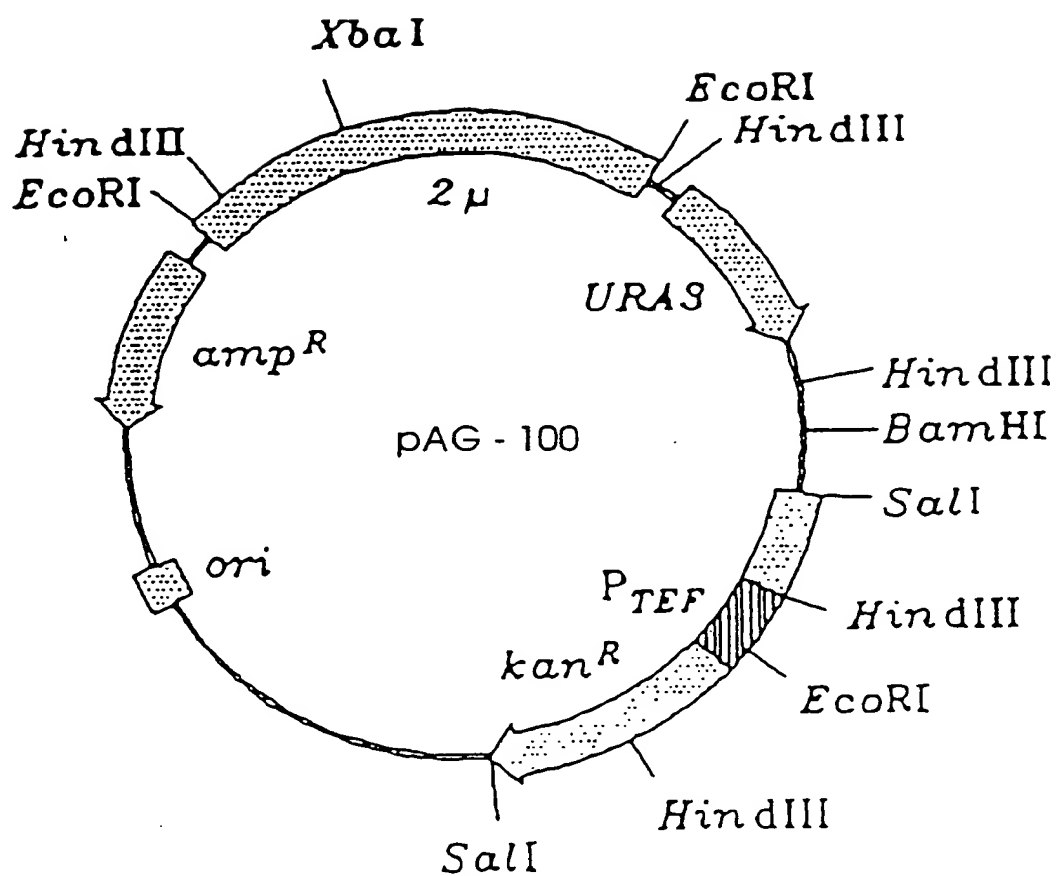
Figur 4



7/10

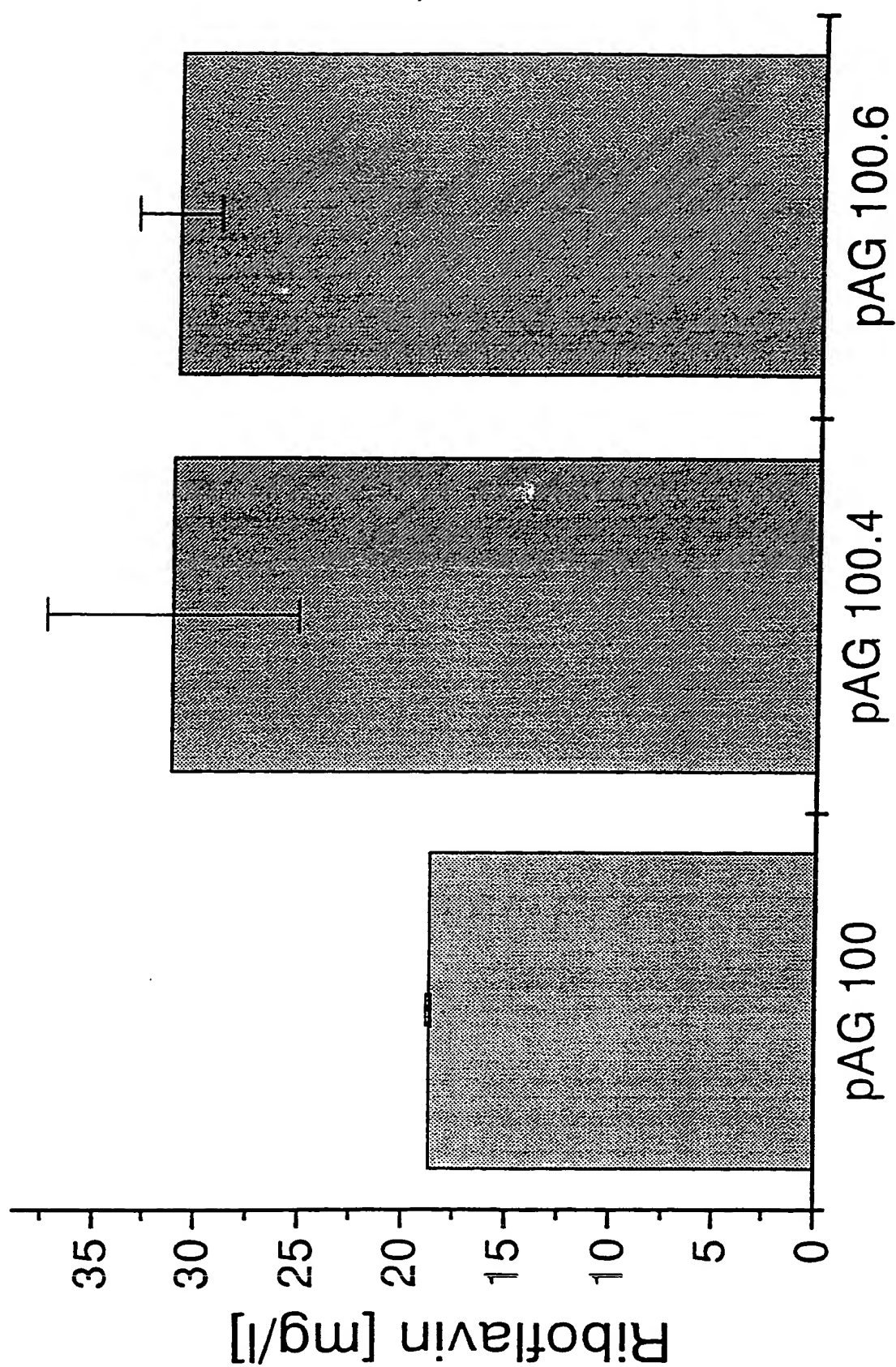
Figur 5

8/10

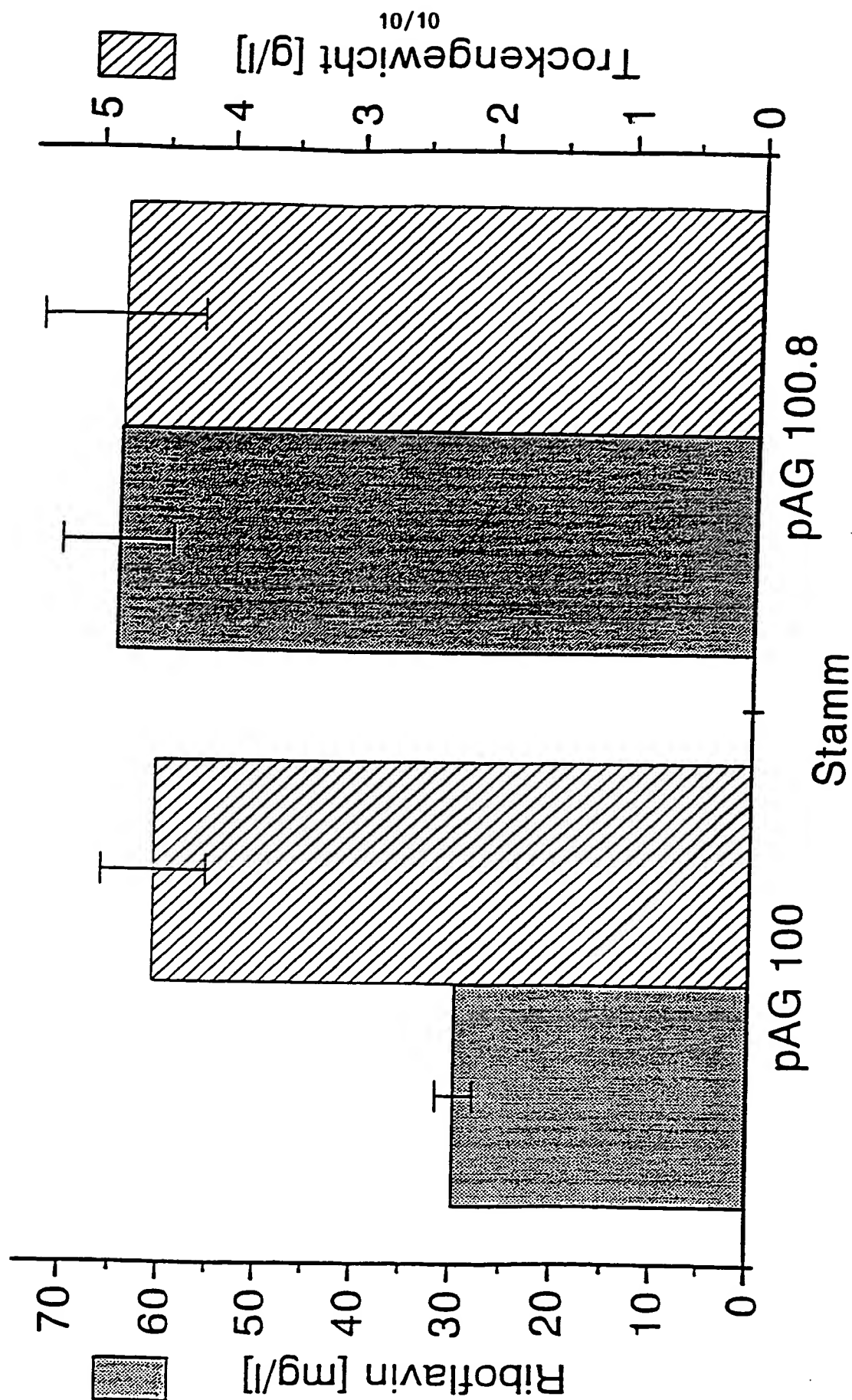


Figur 6

9/10



Figur 7



Figur 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 96/03009

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C12P25/00 C12N15/60 C12N15/31		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12P C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MICROBIOLOGY, vol. 142, no. 2, 1996, READING U.K., pages 411-417, XP002020315 SCHMIDT, G. ET AL.: "Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer <i>Ashbya gossypii</i> " see the whole document ---	1-11
X,P	MICROBIOLOGY, vol. 142, no. 2, 1996, READING, U.K., pages 419-426, XP002020316 SCHMIDT, G. ET AL.: "Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer <i>Ashbya gossypii</i> " see the whole document ---	1-11
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.</span> </div>		
<b>* Special categories of cited documents :</b> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">5 December 1996</div>		Date of mailing of the international search report  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">18.12.96</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Douschan, K</div>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No

PCT/EP 96/03009

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOL. GEN. GENET., vol. 241, 1993, pages 422-430, XP002020317 BARTH, G. UND SCHEUBER, T.: "Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from Yarrowia lipolytica and characterization of the deduced protein" see the whole document ---</p>	1-11
A	<p>EP,A,0 405 370 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2 January 1991 cited in the application see the whole document ---</p>	1-11
A	<p>WO,A,93 03183 (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC.) 18 February 1993 cited in the application see the whole document -----</p>	1-11



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/03009

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0405370	02-01-91	CN-A- 1049185 JP-A- 3117489	13-02-91 20-05-91
WO-A-9303183	18-02-93	AU-A- 1278192 EP-A- 0596885 JP-T- 6508983 NZ-A- 240749	02-03-93 18-05-94 13-10-94 27-04-94

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
 IPK 6 C12P25/00 C12N15/60 C12N15/31

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 6 C12P C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X, P	MICROBIOLOGY, Bd. 142, Nr. 2, 1996, READING U.K., Seiten 411-417, XP002020315 SCHMIDT, G. ET AL.: "Inhibition of purified isocitrate lyase identified itaconate and oxalate as potential antimetabolites for the riboflavin overproducer <i>Ashbya gossypii</i> " siehe das ganze Dokument ---	1-11
X, P	MICROBIOLOGY, Bd. 142, Nr. 2, 1996, READING, U.K., Seiten 419-426, XP002020316 SCHNMIDT, G. ET AL.: "Correlation of isocitrate lyase activity and riboflavin formation in the riboflavin overproducer <i>Ashbya gossypii</i> " siehe das ganze Dokument ---	1-11
-/-		



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Dezember 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18.12.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MOL. GEN. GENET., Bd. 241, 1993, Seiten 422-430, XP002020317 BARTH, G. UND SCHEUBER, T.: "Cloning of the isocitrate lyase gene (ICL1) from Yarrowia lipolytica and characterization of the deduced protein" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	EP,A,0 405 370 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2. Januar 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	WO,A,93 03183 (TRANSKARYOTIC THERAPIES INC.) 18. Februar 1993 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-11

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung: zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03009

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0405370	02-01-91	CN-A- 1049185	13-02-91
		JP-A- 3117489	20-05-91
-----	-----	-----	-----
WO-A-9303183	18-02-93	AU-A- 1278192	02-03-93
		EP-A- 0596885	18-05-94
		JP-T- 6508983	13-10-94
		NZ-A- 240749	27-04-94
-----	-----	-----	-----